

### 研究要旨

乾留製法をとる既存添加物の品質確保を目的として、木酢液、チャ乾留物及びモウソウチク乾留物の成分分析を実施した。NMR を用いた先行研究において、これら添加物の主要成分として酢酸を報告した。他方、GC/MS を用いた分析では、酢酸の他に様々なピークが観察された。これらについて、NIST ライブラリーと照合した結果、原料の熱分解に由来するカルボニル化合物、フラン類、ピラン類、フェノール類及び含窒素化合物の存在が示唆された。本研究は、これら熱分解物について標準品との比較により 36 成分を同定した。また定量分析を行ったところ、これらの含量は最大で 0.5%、合算で 1～4%程度と微量であった。

### 研究協力者

石附京子 国立医薬品食品衛生研究所  
食品添加物部

杉本直樹 国立医薬品食品衛生研究所  
食品添加物部

れた。これらピークの MS スペクトルについて、NIST ライブラリーと照合した結果、原料の熱分解に由来するカルボニル化合物、フラン類、ピラン類、フェノール類及び含窒素化合物の計 54 化合物の存在が示唆された<sup>3)</sup>。そこで本研究は、先行研究で示したこれら原料の熱分解物を対象に GC/MS による定量分析を行うこととした。

### A. 研究目的

わが国の既存添加物名簿には、乾留抽出によって得られる天然添加物として、木酢液、チャ乾留物及びモウソウチク乾留物の 3 品目が収載されている<sup>1)</sup>。既存添加物名簿収載品目リストの概要によると、木酢液はくん香の付与、チャ乾留物は消臭剤、モウソウチク乾留物は日持向上剤と、添加物によって用途が異なる<sup>2)</sup>。これらの品目は全て、第 9 版食品添加物公定書（以下、公定書）に未収載であるため、公的な成分規格の設定が急務となっている。

先行研究において、これら添加物の主要成分について NMR で確認したところ、全ての添加物から酢酸の <sup>1</sup>H ピークが主として観察された。次いで、GC/MS を用いて酢酸の定量分析を行ったところ、その含量は一様ではなく、0.5%～6%程度であった<sup>3)</sup>。この際、酢酸の他に様々なピークがクロマトグラム上で観察さ

### B. 研究方法

#### B-1) 試料及び試薬

試料は、先行研究と同じものを用いた。すなわち、日本食品添加物協会を通じて入手した、チャ乾留物 2 製品（以下、TD1 及び TD2）（当部管理番号：C2193 及び C2190）、モウソウチク乾留物 2 製品（以下、MD1 及び MD2）（当部管理番号：C2093 及び A963）、木酢液（以下、WV1 及び WV2）（当部管理番号：C2111 及び A962）の計 6 製品を試料として用いた。

アセトン（Cat No. 01-0490-7）は SIGMA-ALDRICH 社製のものを用いた。GC/MS 定量分析の内標準物質は、富士フイルム和光純薬製のデカン（Cat No. 043-24992）を用いた。定量分析に用いた標準品の詳細は表 1 に示し

た。

## B-2) GC/MS 分析

装置, 7890B GC system (アジレント・テクノロジー製) 及び JMS-Q1500GC (JEOL 製); カラム, DB-5MS (30 m×0.25 mm, 膜厚 0.25 µm, アジレント・テクノロジー製); 昇温条件, 30°C (5 分間保持) →Δ10°C/min→300°C (5 分間保持); 注入口温度, 250°C; キャリアーガス, He; 流量, 1.0 mL/min; スプリット比, 20 : 1; 注入量, 1 µL; Q-Pole 温度, 100°C; イオン源温度, 230°C; トランスファーライン温度, 250°C; イオン化法, EI; scan モード, *m/z* 20~400; SIM モード, 図 1 を参照。

## B-3) 内標準液の調製

デカン 1 mL を精秤し (調製 n1), アセトンを用いて 20 mL に定容した。この液 1.2mL をアセトンで 100 mL に希釈したものを内標準液とした (0.6µL/mL)。

## B-4) 検量線用混合液の調製

標準品が液体の場合は約 40µL, 固体の場合は約 40mg をそれぞれ精秤し, アセトンを用いて 5 mL に定容し, 標準原液とした (調製 n1)。標準原液 1 mL ずつを 25 mL メスフラスコに分注し, アセトンで定容し, 検量線用混合液 (濃度レベル 640) とした。この原液をアセトンで順次希釈し, 濃度レベル 20, 40, 80, 160, 320 の 5 段階の検量線用混合液を調製した。

## B-5) 試料液の調製

試料はそれぞれ 1 mL を 5 mL メスフラスコに精秤し (調製 n1), アセトンを用いて定容した。この液をアセトンで 10 倍, 100 倍と希釈し, 3 濃度の試料液を調製した。

## B-6) 測定と定量

内標準液と検量線用混合液を 1 : 1(v/v) で混合したものを標準液とし, GC に導入した。得られたクロマトグラムから, デカンのピーク

面積に対する標準被検成分のピーク面積を求め, この比を縦軸に, 標準被検成分の濃度レベルを横軸にとり, 相対検量線を作成した。なお横軸の濃度レベルは, 最終的には調製時に精秤した値で µg/mL に変換して計算に用いた (調製 n1, 測定 n3)。

同様に, 内標準液と試料液を 1 : 1(v/v) で混合したものを検液とし, 検量線を作成したときと同一条件でクロマトグラムを記録させ, その内標準物質のピーク面積に対する被検成分のピーク面積の比を求め, 検量線を用いて被検成分量を求めた (調製 n1, 測定 n3)。

## C. 結果及び考察

### C-1) 標準品を用いた原料熱分解物の同定

先行研究で示した 54 の熱分解物のうち, 36 の標準品が入手できた (表 1)。これら標準品を GC/MS に付し, 保持時間及び MS スペクトルの一致を確認し, 試料中の化合物を同定した。

### C-2) GC/MS による定量分析

同定した 36 化合物について, SIM 測定による定量分析を行うこととした。SIM 測定では測定対象の数が多いため, 2つの MS メソッドを用意した (method-A 及び B) (図 1)。1 ピークあたりのポイント数を確保するため, 定量イオンのみをモニタリングすることとした (表 1)。標準液各 5 濃度の検量線は, 二次曲線で作成した。次に添加物試料 6 製品を測定し, 得られた SIM スペクトルのピーク面積から定量を行った。定量結果を表 2 に示した。表中 ND は, SIM でピークが認められなかったもの, under は検量線の範囲外 (濃度レベル 10 以下) を表す。含量は最大で 0.5% 程度 (TD1 中のカフェイン), 合算で 1~4% 程度と微量であった。

## D. 結論

本研究は木酢液, チャ乾留物及びモウソウチク乾留物の品質確保を目的として, これら添加物中に含まれる原料由来の熱分解化合物について, GC/MS による定量分析を行ったと

ころ、含量は最大で 0.5%程度、合算で 1~4%程度と微量であった。今後は本研究成果を添加物事業者と共有し、具体的な成分規格案の作成を進める予定である。

## E. 参考文献

- 1) 厚生省告示第 120 号“既存添加物名簿”平成 8 年 4 月 16 日 (1996)。
- 2) 日本食品添加物協会技術委員会編“既存添加物名簿収載品目リスト注解書”，日本食品添加物協会，1999，p. 214, 353, 532。
- 3) 令和 2 年度 (2020 年度) 食品・添加物等規格基準策定費，「既存添加物の成分規格の設定」報告書

## F. 研究業績

### 1. 学会発表等

- 1) 加藤菜帆，西崎雄三，増本直子，石附京子，中島馨，大槻崇，松藤寛，杉本直樹，佐藤恭子，天然苦味料ニガヨモギ抽出物の成分規格作成を目的とした基礎的検討，日本食品化学会 第28回総会・学術大会，2022年5月19日
- 2) 西崎雄三，建部千絵，石附京子，増本直子，吉田久美，杉本直樹，佐藤恭子，外部標準法定量NMR (EC-qNMR) によるアントシアニンの純度測定，日本食品化学会 第28回総会・学術大会，2022年5月19日
- 3) 西崎雄三，鳥海栄輔，中西資，石附京子，増本直子，杉本直樹：既存添加物：乾留抽出物製品のPAHs定量分析法の開発と実態調査。第59回全国衛生化学技術協議会年会

(2022.10.31) (川崎市)

- 4) 西崎雄三，石附京子，吉村弘伸，松熊伸也，朝倉克夫，末松孝子，杉本直樹：Q 値を指標にした外部標準法定量 NMR(EC-qNMR)の測定自動化とその定量精度について。第61回NMR討論会(2022.11.8) (高知市)
- 5) 石附京子，西崎雄三，増本直子，杉本直樹，佐藤恭子：乾留抽出により得られる既存添加物の成分比較 (木酢液・チャ乾留物・モウソウチク乾留物)。日本食品衛生学会第118回学術講演会 (2022.11.11) (長崎市)
- 6) 都築明日香，西崎雄三，増本直子，鈴木俊宏，兎川忠晴，杉本直樹：外部標準法定量 NMR (EC-qNMR)：試料間でレーザーバーゲンが異なるときの補正について。第4回日本定量NMR研究会年会 (2022.12.16) (東京)
- 7) 吉成知也，関根葵，小林直樹，西崎雄三，杉本直樹，工藤由起子，渡辺麻衣子：MALDI-ToF MSを用いた既存添加物酵素の基原生物の同定手法に関する研究。日本農芸化学会2023年度大会 (2023.3) (オンライン開催)

### 2. 論文発表等

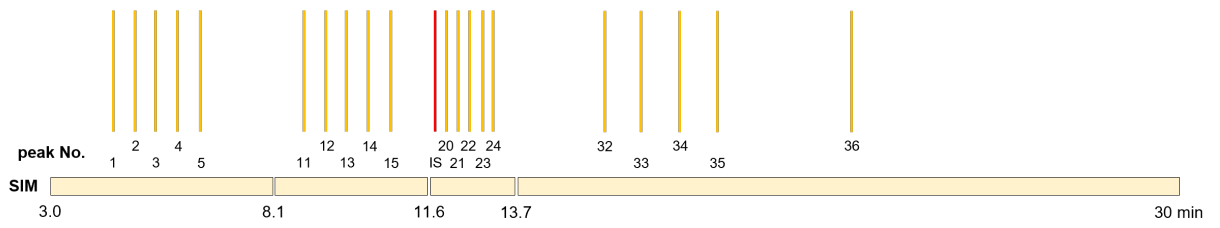
#### 2-1. 総説

- 1) 西崎雄三: qNMR に基づく相対モル感度を利用したクロマトグラフィーによる定量分析. 日本食品衛生学雑誌, 2022 6 月;63(3), J51-J53.
- 2) 西崎雄三: 外部標準法定量 NMR (EC-qNMR) のすすめ. ぶんせき, 2022 12 月;12, 498-503.

## G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

**method-A**



**method-B**

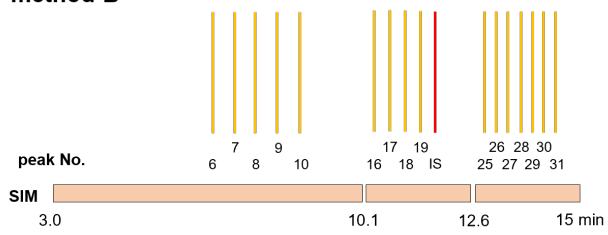


図 1 . SIM測定メソッドの概略図

表1 本研究で用いた標準品の詳細

peak no.	化合物名	CAS No.	分子量	定量イオン	Rt (min)	当部管理番号	製品番号
1	ヒドロキシアセトン	[116-09-6]	74	74	3.46	22100041	SIGMA 138185
2	プロピオン酸	[79-09-4]	74	74	4.31	2T B 2T B2	Wako 163-04726
3	アセトイン	[513-86-0]	88	88	4.49	2T 2LW	TCI H0225
4	プロピオン酸エチル	[105-37-3]	102	102	4.59	2T 23M	Wako 057-01693
5	シクロペンタノン	[120-92-3]	84	84	7.08	32000293	SIGMA C112402
6	<i>n</i> -酪酸	[107-92-6]	88	60	7.30	32000086	Wako 029-05393
7	酪酸エチル	[105-54-4]	116	71	7.48	2T 23N	Wako 052-00663
8	フルフラール	[98-01-1]	96	96	8.25	22100042	TCI F0073
9	2-シクロペンテン-1-オン	[930-30-3]	82	82	8.26	22100043	TCI C0794
10	フルフリルアルコール	[98-00-0]	98	98	8.88	2T 2E7	カイ 16426-92
11	アセトキシアセトン	[592-20-1]	116	43	9.22	22100044	Wako/Combi-Blocks QE-3101
12	2-フリルメチルケトン	[1192-62-7]	110	95	10.16	22100045	SIGMA A16254
13	$\gamma$ -ブチロラクトン	[96-48-0]	86	86	10.16	22100046	SIGMA B103608
14	アセトニルアセトン	[110-13-4]	114	99	10.55	22100047	TCI H0101
15	$\gamma$ -バレロラクトン	[108-29-2]	100	56	11.05	22100048	TCI V0007
16	5-メチルフルフラール	[620-02-0]	110	110	11.27	22100049	SIGMA 137316
17	3-メチル-2(5H)-フラノン	[22122-36-7]	98	98	11.48	22100050	SIGMA 393509
18	2-焦性粘液酸メチル	[611-13-2]	126	126	11.54	22100051	SIGMA 129852
19	フェノール	[108-95-2]	94	94	11.62	04-58b	Wako 167-01022
20	ピロール-2-カルボキシアルデヒド	[1003-29-8]	95	95	12.28	00-42a	TCI P1246
21	3-メチル-1,2-シクロペンタンジオン	[765-70-8]	112	112	12.49	22100052	SIGMA 178500
22	ベンジルアルコール	[100-51-6]	108	108	12.70	2T 2E0	カイ 04521-02
23	1-エチル-1H-ピロール-2-カルボキシアルデヒド	[2167-14-8]	123	123	12.95	22100054	TCI E1416
24	<i>o</i> -クレゾール	[95-48-7]	108	108	12.99	32000310	TCI C0402
25	2-アセチルピロール	[1072-83-9]	109	109	13.20	22100055	TCI A0894
26	<i>m</i> -クレゾール	[108-39-4]	108	108	13.36	32000309	TCI C0401
27	2-フルアルデヒドジエチルアセタール	[13529-27-6]	170	125	13.38	22100056	TCI F0929
28	<i>o</i> -メトキシフェノール	[90-05-1]	124	124	13.60	04-60b	Wako 133-08302

表1 (続き) 本研究で用いた標準品の詳細

peak no.	化合物名	CAS No.	分子量	定量イオン	Rt (min)	当部管理番号	製品番号
29	3-ヒドロキシピリジン	[109-00-2]	95	95	13.80	05-89a	TCI H0331
30	マルトール	[118-71-8]	126	126	13.99	22-36c	フコシ (取扱中止) SSX 6555
31	3-エチル-2-ヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン	[21835-01-8]	126	126	14.10	22100057	TCI E0792
32	<i>o</i> -エチルフェノール	[90-00-6]	122	122	14.39	32000101	TCI E0160
33	<i>p</i> -エチルフェノール	[123-07-9]	122	122	14.87	32000116	TCI E0159
34	2-メトキシ-4-メチルフェノール	[93-51-6]	138	138	15.29	22100058	SIGMA 302880
35	2-メトキシ-4-エチルフェノール	[2785-89-9]	152	152	16.56	22100059	TCI E0353
36	カフェイン	[58-08-2]	194	194	23.52	24-08c	SIGMA 56396
IS	デカン	[124-18-5]	142	142	12.09	04-42b	Wako 043-24992

表 2 GC/MS による添加物製品における原料熱分解物の含量

peak no.	化合物名	TD1		TD2		MD1		MD2		WV1		WV2	
		含量 (%)	RSD (%)	含量 (%)	RSD (%)	含量 (%)	RSD (%)	含量 (%)	RSD (%)	含量 (%)	RSD (%)	含量 (%)	RSD (%)
1	ヒドロキシアセトン	0.17	1.70	0.05	1.87	0.44	2.03	0.71	4.79	0.60	1.85	0.87	1.70
2	プロピオン酸	0.06	4.50	0.01	4.70	0.12	2.49	0.62	4.11	0.47	4.28	0.58	2.70
3	アセトイン	0.04	1.88	0.00	8.65	0.04	1.76	0.05	2.57	0.06	0.42	0.04	1.63
4	プロピオン酸エチル	ND		ND		0.12	13.58	ND		ND		ND	
5	シクロペンタノン	ND		ND		0.02	3.08	0.02	2.29	ND		ND	
6	n-酪酸	ND		ND		0.02	2.62	0.09	0.59	0.10	1.47	0.14	1.90
7	酪酸エチル	ND		ND		0.02	3.09	ND		ND		ND	
8	フルフラール	0.12	1.16	0.01	2.17	0.24	0.41	0.11	1.54	0.01	3.75	0.01	6.25
9	2-シクロペンテン-1-オール	ND		ND		0.02	1.41	0.06	4.58	0.07	0.61	0.07	3.18
10	フルフリルアルコール	0.06	2.65	0.02	4.10	ND		ND		ND		ND	
11	アセトキシアセトン	0.02	1.59	under		under		0.04	2.93	0.01	0.90	0.01	1.88
12	2-フリルメチルケトン	0.01	5.11	under		0.02	8.30	0.06	4.64	0.02	1.38	0.03	2.81
13	γ-ブチロラクトン	0.03	5.23	0.01	2.23	0.02	2.79	0.36	1.17	0.19	3.53	0.27	3.40
14	アセトニルアセトン	ND		ND		under		0.02	2.34	0.03	1.85	0.03	2.99
15	γ-バレロラクトン	ND		ND		ND		0.01	2.57	0.02	3.01	0.03	1.07
16	5-メチルフルフラール	0.03	7.84	under		0.01	3.64	0.01	6.92	0.01	3.84	0.01	3.85
17	3-メチル-2(5H)-フラノン	under		ND		under		0.05	6.96	0.04	4.12	0.06	9.47
18	2-無性粘酸メチル	0.01	8.15	under		0.01	4.28	0.02	9.57	under		under	
19	フェノール	0.01	11.02	under		0.04	7.43	0.21	4.02	0.09	3.52	0.11	2.95
20	ピロール-2-カルボキシアルデヒド	0.02	2.24	under		ND		ND		ND		ND	
21	3-メチル-1,2-シクロペンタジオン	0.01	2.66	ND		0.01	3.32	0.25	6.01	0.09	7.69	0.12	6.05
22	ベンジルアルコール	0.01	3.34	under		ND		ND		ND		ND	
23	1-エチル-1H-ピロール-2-カルボキシアルデヒド	0.01	5.06	under		ND		ND		ND		ND	
24	o-クレゾール	ND		ND		0.01	5.92	0.02	5.73	0.02	2.32	0.03	5.23
25	2-アセチルピロール	0.02	10.35	0.01	6.36	ND		ND		ND		ND	
26	m-クレゾール	ND		ND		0.01	5.49	0.06	11.07	0.03	6.39	0.05	11.39
27	2-フルアルデヒドジエチルアセター	ND		ND		under		ND		ND		ND	
28	o-メトキシフェノール	under		under		0.08	9.15	0.31	4.65	0.15	3.66	0.21	3.48

表 2 (続き) GC/MS による添加物製品中における原料熱分解物の含量

peak no.	化合物名	TD1		TD2		MD1		MD2		WV1		WV2	
		含量 (%)	RSD (%)	含量 (%)	RSD (%)	含量 (%)	RSD (%)	含量 (%)	RSD (%)	含量 (%)	RSD (%)	含量 (%)	RSD (%)
29	3-ヒドロキシピリジン	0.06	3.28	ND		ND		ND		ND		ND	
30	マルトール	0.03	4.46	0.01	8.39	ND		0.18	3.43	0.02	4.62	0.04	7.47
31	3-エチル-2-ヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン	ND		ND		ND		0.13	1.98	0.02	2.85	0.03	7.34
32	o-エチルフェノール	ND		ND		under		0.00	3.86	under		under	
33	p-エチルフェノール	under		ND	4.49	0.01		0.10	9.50	0.01	3.13	0.01	3.71
34	2-メトキシ-4-メチルフェノール	under		ND	7.23	0.01		0.12	4.67	0.05	1.31	0.08	4.29
35	2-メトキシ-4-エチルフェノール	under		under		0.01		0.10	9.97	0.01	6.76	0.01	5.80
36	カフェイン	0.47	22.89	0.13	3.60	ND		ND		ND		ND	
	合計	1.19		0.25		1.25		3.70		2.13		2.83	